

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

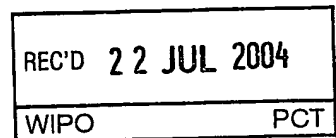
31.5.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2003年 5月29日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2003-152917  
[ST. 10/C]: [JP 2003-152917]



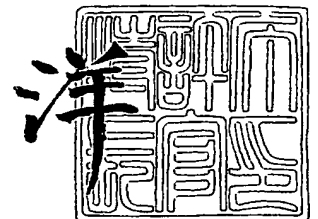
出 願 人  
Applicant(s): 山之内製薬株式会社

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 7月 8日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願  
【整理番号】 YAM033273P  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12N 15/00  
C12Q 1/00

## 【発明者】

【住所又は居所】 東京都板橋区小豆沢 1 - 1 - 8 山之内製薬株式会社内

【氏名】 天水 大介

## 【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内

【氏名】 福永 泰久

## 【発明者】

【住所又は居所】 東京都板橋区小豆沢 1 - 1 - 8 山之内製薬株式会社内

【氏名】 野口 清

## 【特許出願人】

【識別番号】 000006677

【氏名又は名称】 山之内製薬株式会社

## 【代理人】

【識別番号】 100090251

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 森田 憲一

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100089200

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 長井 省三

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100098501

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 森田 拓

【選任した代理人】

【識別番号】 100109357

【弁理士】

【氏名又は名称】 矢野 恵美子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 017813

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 イヌ CYP1A2 遺伝子多型

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 イヌから核酸試料を得、イヌ CYP1A2 遺伝子の第 4 エキソン 87 番目の塩基を決定する工程を含む、薬物代謝速度がエクステンシブ・メタボライザーであるか、又は、プアー・メタボライザーであるかを検出する方法。

【請求項 2】 請求項 1 に記載の方法により薬物代謝速度がエクステンシブ・メタボライザーであるか、又は、プアー・メタボライザーであるかを検出する工程を含む、医薬品の試験に用いるイヌを選別する方法。

【請求項 3】 請求項 2 に記載の方法で選別したエクステンシブ・メタボライザー群又はプアー・メタボライザー群に被験薬を投与する工程を含む、被験薬の薬理効果及び／又は毒性を試験する方法。

【請求項 4】 ストリンジェントな条件で、配列番号 1 で表される塩基配列又はその遺伝子多型を有するイヌ CYP1A2 遺伝子のセンス鎖若しくはアンチセンス鎖にハイブリダイスし、

(1) 配列番号 1 で表される塩基配列における 405 番目に該当する塩基を含み、その 405 番目に該当する塩基が C である、15 塩基以上 30 塩基以下の一本鎖 DNA、

(2) 配列番号 1 で表される塩基配列における 405 番目に該当する塩基を含み、その 405 番目に該当する塩基が T である、15 塩基以上 30 塩基以下の一本鎖 DNA、及び

(3) (1) 若しくは (2) の相補鎖である、15 塩基以上 30 塩基以下の一本鎖 DNA

からなる群から選択される、15 塩基以上 30 塩基以下の一本鎖 DNA。

【請求項 5】 配列番号 14 又は 16 で表される塩基配列からなる、請求項 4 に記載の一本鎖 DNA。

【発明の詳細な説明】

【0001】

**【発明の属する技術分野】**

本発明は、医薬品の試験に用いるイヌ（特にはビーグル犬）の CYP1A2 の一塩基多型（single nucleotide polymorphism；以下、SNP と称する）決定に基づく薬剤代謝における個体間変動の検出、医薬品の試験に用いるイヌの選別方法、及び多型領域の配列決定のための DNA に関する。

**【0002】****【従来の技術】**

薬物代謝とは生体内における酵素による化合物の化学構造の変化である。これら薬物代謝に関与する酵素を薬物代謝酵素という。薬物代謝酵素は、元来、生体内物質（ステロイド、脂肪酸、及び胆汁酸など）の合成又は分解反応を触媒していたものと考えられるが、体内に摂取される薬物又は侵入してくる薬物（異物）を代謝して体外に排出させる役目を持つ。

薬物代謝反応は第 I 相反応と第 II 相反応に大別される。第 I 相反応では、酸化、還元、及び／又は加水分解により、薬物に極性官能基が導入される。第 II 相反応では、第 I 相反応で生成した極性官能基にグルクロン酸、硫酸、又はグルタチオンなどの生体成分を結合させる。これらの反応により薬物はより高度な水溶性を獲得し、体外に排泄されやすくなる。

**【0003】**

第 I 相薬物代謝反応の約 8 割に関与するともいわれる代謝酵素は、チトクローム P450（以下 CYP；cytochrome P450 の略）と呼ばれている。CYP は分子量約 50000（1 個のアミノ酸の分子量を平均 100 とすると約 500 個のアミノ酸から成る）で、補欠分子族として 1 個のプロトヘムを有する。CYP の分類と命名法は、CYP の後にファミリー（アラビア数字）及びサブファミリー（アルファベット）を付けた系統的名称を用いる。すなわち、アミノ酸配列の相同性が 40% を超える分子種を一つのファミリーとする。また、55% を超えるグループをサブファミリーとして小分類する。一つのファミリーに、二つ以上のサブファミリーがあるときはアルファベット順にする（例えば、CYP2A、CYP2B、及び CYP2C）。更に、一つのサブファミリー内の複数の分子種は、表示の最後にアラビア数字を入れる（例えば、CYP1A1）。現在のところ

、哺乳類の薬物代謝型 CYP は 1 から 4 ファミリーまでがある（非特許文献 1）。

#### 【0004】

実験用大動物として望まれるイヌの条件としては、（1）形態又は生理反応等が均一であること、（2）遺伝的な欠落を持たないこと、及び（3）両親や生年月日の明らかであること等が挙げられる。現在ある品種でこれらの条件を最もよく満たしてくれるのはビーグル犬であるといえる（非特許文献 2）。そのため、ビーグル犬は、探索段階の化合物スクリーニング時において安全毒性及び薬物動態大動物試験で繁用される動物種である。近年、ビーグル犬薬物代謝機構を担うイヌ CYP に関しても次第に明らかにされつつある。いくつかのイヌ CYP ファミリーは多彩なクローニング技術により同定されている。CYP 1A1 及び CYP 1A2（非特許文献 3）、CYP 2B11（非特許文献 4）、CYP 2C21 及び CYP 2C41（非特許文献 3 及び非特許文献 5）、CYP 2D15（非特許文献 6）、CYP 2E1（非特許文献 7）、並びに CYP 3A12 及び CYP 3A26（非特許文献 8 及び非特許文献 9）をコードする全又は部分遺伝子は既にクローニングされている。これら CYP の殆どはオープン・リーディング・フレーム（open reading frame；以下、ORF と称する）を含む全配列が明らかにされているが、CYP 1A2 に関しては部分配列しか明らかになっていない。ヒトにおいて CYP 1 ファミリーは A と B の二つのサブファミリーがある。3-メチルコラントレンなどの多環式芳香族炭化水素や 2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾ-p-ジオキシン（TCDD, ダイオキシン）などで誘導される分子種である。CYP 1 ファミリーは CYP の中で最もその機構が保存されており、ヒトと実験動物の基質特異性もよく類似している。がん原性多環式芳香族炭化水素又はマイコトキシン類の酸化、又は、芳香族アミン又は複素環式アミンの窒素原子の水酸化などが代表的な反応であり、がん原物質の代謝的活性化との関係がきわめて深い（非特許文献 10）。

ビーグル犬において CYP 1A1 は肺に微量ながら発現が確認されているが、肝臓には発現していない。CYP 1A2 は肝臓のみに発現しており、全肝臓 CYP の約 4 % を占める（非特許文献 3 及び非特許文献 11）。

## 【0005】

薬物応答性の個体差は薬物代謝能力の差によるものが大きい。薬物代謝能力の差は、最近までは体内動態の違いから見出されてきた。トルブタマイド、デブリソキン、又はスパルテインが典型例として知られている。これらの薬物体内動態の差は、それぞれを代謝するCYP遺伝子の一塩基多型(SNP)による代謝酵素活性の違いに起因することが明らかにされている。すなわち、DNAを構成する4つの塩基の置換により酵素タンパク質のアミノ酸の置換、ストップコドンの導入、又はフレームシフトの形成が生じる。アミノ酸置換では、酵素活性の低下を伴い、ストップコドンの導入及びフレームシフトの形成では、未成熟タンパク質の生成を伴う。そのため、薬物代謝酵素のSNPにより体内動態に大きな個体差が認められる薬物が知られている(非特許文献12)。

## 【0006】

ヒトCYP1A2のSNPでは、遺伝子上流領域にある-3858G>A SNPを生じるCYP1A2\*1C及び164C>A SNPを生じるCYP1A2\*1Fにおいて、CYP1A2の発現量が低下するという報告がある。しかしながら、-164C>Aにおいては、遺伝的要因よりも喫煙による環境的要因により発現量が増加するという報告もある。また、他のヒトCYP1A2のSNPに関してはその機能的な意義についてはまだ不明である(非特許文献13、非特許文献14、及び非特許文献15)。

## 【0007】

SNPは、CYPにおいて最も広範に検討されているが、CYP以外の酵素又は薬物輸送担体での知見も多い。チオプリンメチル転移酵素(thiopurine S-methyltransferase; 以下、TPMTと称する)はいくつかのチオプリン系薬物のメチル化反応を触媒する酵素である。TPMTは、主に肝臓に存在するが、赤血球にも存在が認められることから、赤血球を用いたヒトにおける表現型解析が行われてきた。赤血球中の活性を指標とした場合、白人種の活性は三相性を示し、活性の高い者が88.6%、中間の者が11.1%、及び低い者が0.3%存在する。エバンス(Evans)らは、6-メルカプトプリンにより急性の汎血球減少を起こした白血病患者のTPMTの遺伝子を解析し、酵素活性を消失させるような

アミノ酸置換を伴う点突然変異が3つ (TPMT\*2, TPMT\*3A及びTPMT\*3C) 存在することを明らかとした (非特許文献16)。サラバジオン (Salavaggione) らは、同様にイヌTPMTに関しても多型性を検討した。表現型解析の結果は、ヒトと同様の個体差が存在することを示したが、遺伝子診断の結果では有意なTPMTのSNPを発見するには至らなかった (非特許文献17)。

#### 【0008】

また、薬物輸送担体であるP糖タンパク質 (P-glycoprotein; 以下、P-gpと称する) をコードするMDR1 (multi drug resistance) 遺伝子では、ヒトにおいていくつかのSNPが報告されている。ホフマイヤー (Hoffmeyer) らは、白人被験者を対象として、P-gpをコードするMDR1遺伝子の第26エキソン3435番目の塩基がCからTに置換する遺伝子変異に伴い、消化管におけるMDR1発現量が低下し、ジゴキシンの経口投与後の血漿中濃度が高くなることを報告した (非特許文献18)。ミレイ (Mealey) らは、中枢神経系におけるマクロライド系抗生物質アイバメクチンのコリー犬感受性の違いは、mdr1遺伝子に生じるフレームシフト変異によって引き起こされる未成熟P-gpによることを明らかとした (非特許文献19)。

#### 【0009】

薬物代謝酵素に関与するイヌ関連のSNPでは、ポールソン (Paulson) らが、ビーグル犬においてシクロオキシゲナーゼII阻害剤であるセレコキシブの代謝速度がエクステンシブ・メタボライザー (extensive metabolizer; 以下、EMと称する) 群及びプアー・メタボライザー (poor metabolizer; 以下、PMと称する) 群に分類することができることを報告している。この多型性にはCYP2Dサブファミリーの関与が示唆されているが、詳細については不明である (非特許文献20)。

#### 【0010】

宮下 (Miyashita) らは、フォスフォジエステラーゼIV阻害薬である4-シクロヘキシル-1-エチル-7-メチルピリド [2, 3-d] ピリミジン-2 (1H)-オンの血漿中代謝物パターンが異なる2群のビーグル犬が存在することを



明らかとしている（非特許文献21）。

東（Azuma）らは、 $\alpha 7$ -ニコチンアセチルコリンレセプターアゴニストであるGTS-21のビーグル犬における代謝物血漿中濃度に個体差が生じることを報告している。この個体差にCYP1Aの発現量の違いが関与していることを示唆している（非特許文献22）。

三瀬（Mise）らも、東（Azuma）らと同様に、CYP1Aの発現量差によって抗ベンゾジアゼピン系アンタゴニストであるAC-3933のビーグル犬血漿中濃度に個体間でのバラツキが生じることを報告している（非特許文献23）。

しかしながら、ビーグル犬薬物代謝能力の表現型解析の個体差を明らかとするイヌCYPのSNPに関する遺伝子診断での解明はまだなされていない。

#### 【0011】

##### 【非特許文献1】

加藤隆一・鎌滝哲也編，「薬物代謝学 医療薬学・毒性学の基礎として」，第2版，東京化学同人，2000年10月，p. 9-19

##### 【非特許文献2】

及川弘著，「犬の生物学」，初版，朝倉書店，1969年9月，p. 179-18

7

##### 【非特許文献3】

「モルキュラー・ファーマコロジー（Molecular pharmacology）」，（アメリカ），1990年，第38巻，p. 644-651

##### 【非特許文献4】

「アーカイブス・オブ・バイオケミストリー・アンド・バイオフィジックス（Archives of biochemistry and biophysics）」，（アメリカ），1990年，第281巻，p. 106-115

##### 【非特許文献5】

「ドラッグ・メタボリズム・アンド・ディスポジション（Drug metabolism and disposition）」，（アメリカ），1998年，第26巻，p. 278-283

##### 【非特許文献6】

「アーカイブス・オブ・バイオケミストリー・アンド・バイオフィジ

ックス (Archives of biochemistry and biophysics) 」, (アメリカ), 1995年, 第319巻, p. 372-382

【非特許文献 7】

「ドラッグ・メタボリズム・アンド・ディスポジション (Drug metabolism and disposition) 」, (アメリカ), 2000年, 第28巻, p. 981-986

【非特許文献 8】

「バイオキミカ・エト・バイオフィジカ・アクタ (Biochimica et biophysica acta) 」, (アメリカ) 1991年, 第1088巻, p. 319-322

【非特許文献 9】

「ザ・ジャーナル・オブ・ファーマコロジー・アンド・エクスペリメンタル・セラピューティクス (The journal of pharmacology and experimental therapeutics) 」, (アメリカ) 1997年, 第283巻, p. 1425-1432

【非特許文献 10】

加藤隆一・鎌滝哲也編, 「薬物代謝学 医療薬学・毒性学の基礎として」, 第2版, 東京化学同人, 2000年10月, p. 19-20

【非特許文献 11】

「ゼノビオティカ (Xenobiotica) 」, (イギリス), 1996年, 第26巻, p. 755-763

【非特許文献 12】

ワナー・カロウ (Warner Kalow), ウルス・メイヤー (Urs Meyer), レイチェル・ティンダル (Rachel Tyndale) 編, 石川智久監訳, 「ファーマコゲノミクス 21世紀の創薬と個の医療」, 第1版, テクノミック, 2002年12月, p. 29-43

【非特許文献 13】

「ザ・ジャパニーズ・バイオケミカル・ソサイエティー (The Japanese biochemical society) 」, (日本), 1999年, 第125巻, p. 803-808

【非特許文献 14】

「ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・クリニカル・ファーマコロジー (British journal of clinical pharmacology) 」, (イギリス), 1999年, 第

47巻, p. 445-449

【非特許文献 15】

「ファーマコジェネティクス (Pharmacogenetics)」, (アメリカ), 1999年, 第9巻, p. 367-375

【非特許文献 16】

加藤隆一・鎌滝哲也編, 「薬物代謝学 医療薬学・毒性学の基礎として」, 第2版, 東京化学同人, 2000年10月, p. 141-155

【非特許文献 17】

「ファーマコジェネティクス (Pharmacogenetics)」, (アメリカ), 2002年, 第12巻, p. 713-724

【非特許文献 18】

「プロシディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユナイティッド・ステート・オブ・アメリカ (Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America)」, (アメリカ), 2000年, 第97巻, p. 3473-3478

【非特許文献 19】

「ファーマコジェネティクス (Pharmacogenetics)」, (アメリカ), 2001年, 第11巻, p. 72-733

【非特許文献 20】

「ドラッグ・メタボリズム・アンド・ディスポジション (Drug metabolism and disposition)」, (アメリカ), 1999年, 第27巻, p. 1133-1142

【非特許文献 21】

「第17回日本薬物動態学会年会ポスター発表」, (日本), 2002年, 20PE-46

【非特許文献 22】

「ドラッグ・メタボリズム・アンド・ファーマコキネティクス (Drug metabolism and pharmacokinetics)」, (日本), 2002年, p. 75-82

【非特許文献 23】

「第11回ノース・アメリカン・アイエスエスエックス・ミーティング

(11th North American ISSX meeting)」, (アメリカ), 2002年, 304

#### 【0012】

##### 【発明が解決しようとする課題】

化合物の薬理効果及び毒性の発現が依存する体内動態に大きな影響を与える、代謝能力の個体差が大きいイヌを用いて、医薬品候補である化合物の薬理効果試験及び毒性試験を行っているため、薬理効果及び毒性評価において個体差が大きく、データがばらつくという問題が生じている。

本発明の課題は、イヌ（特にはビーグル犬）における薬理効果試験及び毒性試験の実施に先立ち、使用される個体のCYP1A2の遺伝子診断を迅速に実施し、正常な代謝能力を持つ群（EM群）、又は、薬物代謝能力が低い群（PM群）に、群分けすることができる簡便な方法を提供し、遺伝的に均質な個体により薬理効果試験及び毒性試験を実現することができ、正確な薬理効果及び毒性評価を可能とすることにある。

#### 【0013】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者は、前記課題を解決するために鋭意研究を行なった結果、試験化合物として4-シクロヘキシル-1-エチル-7-メチルピリド[2, 3-D]ピリミジン-2(1H)-オンを選択し、そのEM型及びPM型を決定するイヌCYP1A2のSNPを決定し、PM型では、塩基置換により、CYP1A2のORFの途中でストップコドンが生じていることを見出した。次いで、血液サンプルより前記SNPの位置の配列を検出する簡便な方法（ASP-PCR法及びダイレクトシーケンス法）を確立し、4-シクロヘキシル-1-エチル-7-メチルピリド[2, 3-D]ピリミジン-2(1H)-オンを投与したEM群及びPM群各5例について前記SNP領域の配列を決定し、PM群ではいずれも塩基置換によりストップコドンが生じていること、EM群では、ヘテロ又はホモでストップコドンを生じずにCYP1A2をコードする遺伝子を有していることを確認し、本発明を完成した。

#### 【0014】

すなわち、本発明は、

[1] イヌから核酸試料を得、イヌ CYP1A2 遺伝子の第4エクソン87番目の塩基を決定する工程を含む、薬物代謝速度がエクステンシブ・メタボライザーであるか、又は、プアー・メタボライザーであるかを検出する方法；

[2] [1] 記載の方法により薬物代謝速度がエクステンシブ・メタボライザーであるか、又は、プアー・メタボライザーであるかを検出する工程を含む、医薬品の試験に用いるイヌを選別する方法；

[3] [2] 記載の方法で選別したエクステンシブ・メタボライザー群又はプアー・メタボライザー群に被験薬を投与する工程を含む、被験薬の薬理効果及び／又は毒性を試験する方法；

[4] ストリンジェントな条件で、配列番号1で表される塩基配列又はその遺伝子多型を有するイヌ CYP1A2 遺伝子のセンス鎖若しくはアンチセンス鎖にハイブリダイスし、

(1) 配列番号1で表される塩基配列における405番目に該当する塩基を含み、その405番目に該当する塩基がCである、15塩基以上30塩基以下の一本鎖DNA、

(2) 配列番号1で表される塩基配列における405番目に該当する塩基を含み、その405番目に該当する塩基がTである、15塩基以上30塩基以下の一本鎖DNA、及び

(3) (1) 若しくは(2) の相補鎖である、15塩基以上30塩基以下の一本鎖DNA

からなる群から選択される15塩基以上30塩基以下の一本鎖DNA；並びに

[5] 配列番号14又は16で表される塩基配列からなる、[4] 記載の一本鎖DNA  
に関する。

【0015】

#### 【発明の実施の形態】

##### [A] 本発明の検出方法及びイヌ選別方法

本発明の検出方法では、イヌから核酸試料を得、イヌ CYP1A2 遺伝子の第4エクソン87番目の塩基を決定することにより、薬物代謝速度がエクstens

イブ・メタボライザー (EM) であるか、又は、プアー・メタボライザー (PM) であるかを検出する。前記塩基が、C/C 遺伝子型又は C/T 遺伝子型である場合には、EM であると判定することができ、T/T 遺伝子型である場合には、PM であると判定することができる。

また、本発明のイヌ選別方法では、本発明の検出方法により EM 又は PM のいずれであるかを検出し、医薬品の試験に用いるイヌを選別する。

#### 【0016】

##### 1. イヌの核酸を含む試料の調製

本発明の方法で用いられる核酸試料、好ましくはイヌゲノム DNA を含む試料は、イヌ（特にはビーグル犬）から単離されたあらゆる細胞（但し、生殖細胞を除く）、組織、又は臓器等を材料として調製することができる。前記材料としては、末梢血から分離した白血球又は単核球が好ましく、特に白血球が最も好適である。これらの材料は、生化学検査において通常用いられる方法に従って単離することができる。

#### 【0017】

例えば、白血球を材料とする場合、まずイヌ（例えば、ビーグル犬）より単離した末梢血から常法に従って白血球を分離する。次いで、得られた白血球にプロテイナーゼ K とドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を加えてタンパク質を分解及び変性させた後、フェノール/クロロホルム抽出を行うことによりゲノム DNA (RNA を含む) を得る。RNA は、必要に応じて RNアーゼにより除去することができる。但し、ゲノム DNA の抽出は、前記方法に限定されず、当該技術分野で周知の方法 [例えば、Sambrook, J. et al. (1989): "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Ed.)" Cold Spring Harbor Laboratory, NY] や、市販の DNA 抽出キット等を利用して行うこともできる。また、常法で抽出したイヌ mRNA から cDNA を製造し、遺伝子多型の検出に用いることもできる。

#### 【0018】

##### 2. 遺伝子多型の検出

次に、得られたイヌ核酸を含む試料から、本発明者らによって解明された、C

YP1A2 遺伝子第4エキソンの87番目の塩基がCからTへと置換するSNPの遺伝子型を診断する。以下、本発明方法で用いることができる代表的な遺伝子多型検出方法について説明する。

#### 【0019】

##### (1) RFLP (制限酵素切断断片長多型) 法

遺伝子多型部位が制限酵素認識部位に含まれる場合、その制限酵素の消化により生じるDNA断片の長さの違いから、前記遺伝子多型の検出が可能である。この場合、(a) DNAを制限酵素で分解後、サザンブロットを行う方法と、(b) 多型部位を含むDNA断片をPCR増幅後、制限酵素で切断し、電気泳動により切断されるDNA断片の大きさを解析する方法とが挙げられる。

(a) の方法で用いられるプローブとしては、目的の多型部位を含んで、且つその多型部位から5'末端側及び3'末端側にそれぞれ約0.5~2 kbにわたる配列に相当するDNA断片(アイソトープ、ビオチン、又は蛍光色素等で標識されたもの)が好ましい。また、(b) の方法で用いられるPCRプライマーとしては、多型部位を含む約0.05~4 kbのDNA断片を増幅するための、15~30塩基のオリゴヌクレオチドが好ましい。

#### 【0020】

##### (2) PCR-SSCP (一本鎖DNA高次構造多型解析) 法

PCR-SSCP法は、遺伝子多型部位を含むDNA断片をPCRで増幅後、熱変性し、電気泳動により、高次構造の異なる1本鎖DNAを分離する方法[「バイオテクニクス (Biotechniques)」, 1994年, 第16巻, p. 296-297; 及び「バイオテクニクス (Biotechniques)」, 1996年, 第21巻, p. 510-514]である。遺伝子多型の有無により、1本鎖DNAの泳動距離が異なるため、そのパターンを解析することにより、多型のタイピングが可能である。タイピングの標準とするために、予め多型部位の塩基配列が確認されているDNA試料を、PCRの際の鋳型DNAとして、被験試料と同時に用いることが好ましい。PCR増幅用プライマーとしては、5'末端を蛍光標識した、多型部位を含む約50~500 bpのDNA断片を増幅するための、15~30塩基のオリゴヌクレオチドが好ましい。

## 【0021】

## (3) ASO (Allele specific oligonucleotide) ハイブリダイゼーション法

ASOハイブリダイゼーション法は、遺伝子多型部位を含むDNA断片を支持体（例えば、ナイロンフィルター等）にドットプロットし、それぞれの遺伝子多型に対応したプローブとのハイブリダイゼーション後、そのプローブのT<sub>m</sub>値（溶解温度：melting temperature）に準じた洗浄操作を行い、多型を検出（ミスマッチがあればハイブリッドが外れる）する方法〔「クリニカ・ケミカ・アクタ；インターナショナル・ジャーナル・オブ・クリニカル・ケミストリー（Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry）」, 1990年, 第189巻, p. 153-157〕である。プローブとしては、15～25塩基程度の合成オリゴヌクレオチド（シグナルを得るためには、ラジオアイソトープ、ビオチン、又は蛍光色素による標識が必要）が好ましい。

## 【0022】

## (4) ダイレクトシーケンス法

ダイレクトシーケンス法は、遺伝子多型部位を含むDNA断片をPCR増幅した後、増幅されたDNAの塩基配列を直接ダイデオキシ法により解析する方法〔「バイオテクニクス（Biotechniques）」, 1991年, 第11巻, p. 246-249〕である。この方法で用いられるPCRプライマーは、好ましくは、多型部位を含む約0.05～4 kbのDNA断片を増幅するための、15～30塩基のオリゴヌクレオチドである。また、シーケンスプライマーとしては、好ましくは、多型部位から50～300ヌクレオチド程度5'末端側の位置に相当する15～30塩基のオリゴヌクレオチドを用いる。

## 【0023】

## (5) ASP-PCR (Allele specific primer - PCR) 法

PCRでは、鋳型DNAにプライマーがアニールした後、DNAポリメラーゼにより5'末端側から3'末端側に相補鎖DNAが合成される。プライマーの3'末端塩基にミスマッチがあると、PCRの効率が低下し、電気泳動による検出が不可能になる。ASP-PCR法は、その3'末端塩基が検出しようとする変異塩基に相補的になるように設計されたプライマーを用いてPCRを行い、増幅



産物の有無で遺伝子多型を検出する方法 [「ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic acids research)」, 1991年, 第19巻, p. 3561-3567; 及び「ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic acids research)」, 1992年, 第20巻, p. 4831-4837] である。この方法で用いられるPCRプライマーは、一方は、3'末端に多型部位が位置するように設計された、好ましくは、15～30塩基のオリゴヌクレオチドであり、もう一方は、好ましくは、多型部位から0.05～2kb程度離れた部分の15～30塩基のオリゴヌクレオチドである。

#### 【0024】

(6) 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 [Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)] 法

DGGE法は、DNA断片中の、ミスマッチを有するヘテロデュプレックスが、ホモデュプレックスよりも解離が容易であることを利用して遺伝子多型を検出する方法 [「バイオテクニクス (Biotechniques)」, 1999年, 第27巻, p. 1016-1018] である。ヘテロデュプレックスは、解離が進むにつれ、ゲル電気泳動における移動度が低下するので、使用するポリアクリルアミドゲル中に尿素及びホルムアミドの密度勾配を設定しておく、ホモデュプレックスとの移動度の差が更に強調され、ミスマッチを含む2本鎖DNAの存在、すなわち、変異の存在が検出される。この方法で用いられるPCRプライマーは、多型部位を含む約0.05～0.5kbのDNA断片を増幅するための、15～30塩基のオリゴヌクレオチドが好ましい。

#### 【0025】

(7) RNアーゼA切断法

RNアーゼA (RNA分解酵素) は、2本鎖RNA又はRNA/DNAコンプレックスを分解せず、1本鎖のRNAのみを分解する特性を有する。従って、多型部位を含むDNA断片をPCR増幅した後、アイソトープ標識したRNAプローブを、変性して1本鎖にしたDNA断片とハイブリダイズさせ、RNアーゼA処理後、電気泳動により分解すれば、変異型とハイブリダイズしたRNAプローブはミスマッチ部位で切断されるため、2本のバンドとして検出することができる [「ディエヌエー・アンド・セル・バイオロジー (DNA and cell biology)」]

、1995年、第14巻、p. 87-94]。この方法で用いられるRNAプローブとしては、多型部位を含む通常15～30塩基のオリゴヌクレオチドが好ましい。

#### 【0026】

##### (8) 化学切断法

多型部位を含むDNA断片をPCRにより増幅後、2本鎖DNAのミスマッチ部位の「C (シトシン)」に対してはヒドロキシルアミン、「T (チミン)」に対してはオスミウムテトラオキシドで別個に修飾し、ピペリジン処理をすると、糖が切断される。標識プローブを用いて2本鎖を形成させ、前記処理を行った後、電気泳動し、プローブのサイズが短くなっていれば変異が検出されたことになる [バイオテクニクス (Biotechniques) ] , 1996年、第21巻、p. 216-218]。この方法で用いられるPCRプライマーは、多型部位を含む約0.05～4 kbのDNA断片を増幅するための、15～30塩基のオリゴヌクレオチドが好ましい。

#### 【0027】

##### (9) DOL (Dye-labeled oligonucleotide ligation) 法

DOL法は、遺伝子多型を含むDNA断片をPCR増幅した後、蛍光標識された多型部位の直前の塩基まで含むダイプライマーと、それぞれのアレルに特異的な蛍光色素で標識されたダイターミネーターを耐熱性DNAリガーゼで連結させる方法 [「ゲノム・リサーチ (Genome research) , 1998年、第8巻、p. 549-556」] である。この方法で用いられるPCRプライマーは、多型部位を含む約0.05～2 kbのDNA断片を増幅するための、15～30塩基のオリゴヌクレオチドが好ましい。

#### 【0028】

##### (10) TaqMan PCR法

TaqMan PCR法は、蛍光標識したアレル特異的オリゴヌクレオチド (TaqManプローブ) とTaqDNAポリメラーゼによるPCRを利用した方法 [「ジェネティック・アナリシス: バイオモルキュラー・エンジニアリング (Genetic analysis: biomolecular engineering) 」 , 1999年、第14巻、p. 143-149 ; 及び「ジャーナル・オブ・クリニカル・マイクロバイオロジー (Journal of

clinical microbiology) 」, 1996年, 第34巻, p. 2933-2936] である。この方法で用いられるPCRプライマーは、多型部位を含む約0.05~2kbのDNA断片を増幅するための、15~30塩基のオリゴヌクレオチドが好ましい。また、TaqManプローブは、多型部位を含む15~30塩基程度のオリゴヌクレオチドが好ましく、5'末端は蛍光レポーター色素によって標識されており、3'末端はクエンチャー（消光物質）によって標識されている。このプローブを用いることにより、野生型と変異型の塩基変化の検出が可能である。

### 【0029】

#### (11) インベーター法

インベーター法では、2種類の非蛍光標識オリゴヌクレオチドと1種類の蛍光標識オリゴヌクレオチドが使用される。非蛍光標識オリゴヌクレオチドの一つは、その5'末端側に、検出しようとする多型部位の存在するゲノム配列（以下、「鋳型」と称する）とは無関係な配列（以下、「フラップ」と称する）を有しており、フラップより3'末端側は、鋳型の多型部位から5'末端側の配列に特異的な相補配列となっている（以下、「アレルプローブ」と称する）。すなわち、アレルプローブの鋳型に特異的な相補配列部位の5'末端は鋳型の多型部位に相当する。もう一つの非蛍光標識オリゴヌクレオチドは、鋳型の多型部位から3'末端側の配列に特異的な相補配列を有する（以下、「インベータープローブ」と称する）。インベータープローブの3'末端も鋳型の多型部位に相当するが、鋳型の多型部位の塩基とは相補的ではなくてもよい。蛍光標識オリゴヌクレオチド [以下、「FRET (fluorescence resonance energy transfer) プローブ」と称する] は、3'末端側部分がフラップと相補的な配列であり、5'末端側はパリンドローム配列になっているため、自ら二本鎖を形成している。また、FRETプローブの5'末端近傍は蛍光色素で標識され、5'末端にはその蛍光を打ち消すクエンチャーが結合している。

### 【0030】

まず、鋳型にアレルプローブとインベータープローブをハイブリダイズさせると、アレルプローブと鋳型とが多型部位において相補的である場合は、その多型部位において、鋳型、アレルプローブの5'末端、及びインベータープローブの

3' 末端が特殊な構造を形成する。この構造を特異的に認識してエンドヌクレアーゼ活性を表す酵素（以下、「クリベース」と称する）が、アレルプローブからフラップ部分を切り離す。遊離したフラップはFRETプローブの3' 末端側とハイブリダイズする。このとき、フラップとFRETプローブとが、FRETプローブのクエンチャーが結合している5' 末端の位置において、クリベースに特異的に認識される構造を形成するため、クエンチャーが結合している5' 末端ヌクレオチドがクリベースによりFRETプローブから切り離されて、FRETプローブに残った蛍光色素が蛍光を発する。

#### 【0031】

一方、鋳型配列に変異が存在し、アレルプローブと鋳型とが多型部位において相補的でなく、ミスマッチとなっている場合は、クリベースに特異的に認識される構造が形成されないため、フラップはアレルプローブから切り離されない。このとき、切り離されずにアレルプローブに残ったままのフラップもFRETプローブの3' 末端側とハイブリダイズ可能であるが、アレルプローブから切り離されたフラップがハイブリダイズした場合と比較すると、クエンチャーが結合している5' 末端ヌクレオチドがクリベースによってFRETプローブから切り離される反応効率が低いため、FRETプローブが発する蛍光強度も低い。以上の原理により、多型の検出が可能となる[「サイエンス (Science)」, 1993年, 第5109巻, 778-783; 「ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The journal of biological chemistry)」, 1999年, 第30巻, p. 21387-21394; 及び「ネイチャー・バイオテクノロジー (Nature biotechnology)」, 1999年, 第17巻, p. 292-296]。

#### 【0032】

(12) MALDI-TOF/MS (Matrix assisted laser desorption-time of flight/mass spectrometry) 法

MALDI-TOF/MS法は、遺伝子多型のアレルに対応して異なる塩基配列を含む1本鎖オリゴヌクレオチドを合成してその質量を測定し、その差異を質量分析器により検出することによりタイピングする方法[「ゲノム・リサーチ (Genome research)」, 1997年, 第7巻, p. 378-388]; 「ヨーロッパ・ジャーナ

ル・オブ・クリニカル・ケミストリー・アンド・クリニカル・バイオケミストリー：ジャーナル・オブ・ザ・フォーラム・オブ・ヨーロッパ・クリニカル・ケミストリー・ソサイエティ (European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry: journal of the forum of European clinical chemistry societies) 」, 1997年, 第35巻, p. 545-548] である。MALDI-TOF/MS法では、はじめに多型部位を含むDNA断片をPCR増幅し、その後、多型部位に隣接するプライマーを用いた伸張反応により、それぞれのアレルに特異的なDNA伸張反応物をマススペクトルに基づき解析する。このときに用いられるPCRプライマーは、多型部位を含む約0.05~0.5kbのDNA断片を増幅するための、15~30塩基のオリゴヌクレオチドが好ましい。また、多型を検出するためのプライマーは、多型部位に隣接した15~30塩基のオリゴヌクレオチドを用いることが好ましい。

#### 【0033】

(13) TDI (Template-directed dye-terminator incorporation) 法

TDI法は、遺伝子多型を含むDNA断片をPCRで増幅させた後、多型部位の直前に設計されたプライマーを用いて、プライマー伸張反応により、それぞれのアレルに対応する異なる蛍光色素で標識されたダイデオキシヌクレオチドを多型部位に取り込ませる方法で [「プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユナイテッド・ステイト・オブ・アメリカ (Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America) 」, 1997年, 第94巻, p. 10756-10761] である。プライマー伸張産物は、DNAシーケンサー (ABIプリズム377, アプライドバイオシステム社) などを用いて解析する。このときに用いられるPCRプライマーは、多型部位を含む約0.05~1kbのDNA断片を増幅するための、15~30塩基のオリゴヌクレオチドが好ましい。

#### 【0034】

(14) モレキュラー・ビーコン (Molecular beacons) 法

モレキュラー・ビーコンは、両末端に発光抑制体 (Quencher) と蛍光体 (Fluorophore) を持ったオリゴヌクレオチドである。ステム部分が5~7塩基でルー

プ構造が15～30塩基のシステムループ構造が好ましい。従って、蛍光体は発光抑制体の働きにより、励起光照射下でも発光しない。一方、ループ構造内の塩基配列と相同なターゲットのDNAとループ構造内の塩基配列がハイブリダイズすると、発光抑制体と蛍光体の距離が離れるために、蛍光体が励起光下で励起し蛍光を発する[「ネイチャー・バイオテクノロジー (Nature biotechnology)」, 1998年, 第1巻, p. 49-53; 及び「遺伝子医学」2000年, 第4巻, p. 46-48]。モレキュラー・ビーコンのステム部分の塩基配列は、ターゲットDNAとは相補的ではない。モレキュラー・ビーコンのステム構造の $T_m$ 値は、ターゲット領域をPCRで増幅させるときにモレキュラー・ビーコンを反応液にいて、PCRのアニーリング温度で励起光を当て蛍光を測定すると、モレキュラー・ビーコンがターゲット遺伝子に完全に相同な配列であれば、ハイブリダイズするため蛍光を発する。逆にミスマッチがあれば、モレキュラー・ビーコンはターゲットにハイブリダイズできず、蛍光を発することができない。この方法により遺伝子多型を検出することができる。

### 【0035】

(15) ダイナミック・アレルースペシフィック・ハイブリダイゼーション [Dynamic allele-specific hybridization (DASH)] 法

ターゲットDNA (60～90塩基対) をゲノムDNAからPCRで増幅する際に、末端をビオチン化したプライマーを用いて行う方法[「ネイチャー・バイオテクノロジー (Nature biotechnology)」, 1998年, 第1巻, p. 87-88; 及び「遺伝子医学」2000年, 第4巻, p. 47-48]である。PCR終了後、ビオチン化したプライマー側のストランド (strand) は、ストレプトアビジン (streptavidin) でコーティングされたマイクロタイターウェルに結合する。これに対して、未修飾のプライマー側のストランドは結合することができず、アルカリ溶液でリンスすると除去される。その後、このビオチン化したプライマーのストランドに対して、プローブDNA (好ましくは15～21塩基) をハイブリダイズさせる。この時に2本鎖DNAに特異的に結合し、蛍光を発する蛍光物質 (syber green I dye) を一緒に取り込ませる。その後、この蛍光強度を観察しながら変性 (denature) させる。ターゲットDNAとプローブDNAが完全に相補的でなくミ

スマッチがあったときには、完全に相補的である場合に比べ、変性し、発光しなくなる温度が低くなる。この温度の違いを観察することにより、遺伝子多型を検出することができる。

#### 【0036】

##### (16) パドロック・プローブ (Padlock probe) 法

リザルジィ (Lizardi) らによって開発された方法 [「ネイチャー・ジェネティクス (Nature genetics)」, 1998年, 第3巻, p. 225-232; 及び「遺伝子医学」, 2000年, 第4巻, p. 50-51] である。一本鎖ターゲットDNAにハイブリダイズするとプローブが環状になるように設計したプローブを用い、ターゲットDNAにハイブリダイズした後にDNAリガーゼで結合させて完全な環状にし、その後アルカリフォスファターゼ [Calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP)] の脱リン酸化酵素でリン酸基を除去する。末端にミスマッチがあり環状になれなかった場合、リン酸基がなくなり環状化できなくなる。この環状DNAに対してプライマー (1) を設計し、DNAポリメラーゼで複製してレプリコン多量体を得る。このレプリコンに対してもプライマー (2) を設計し、この2種類のプライマーを一緒に混ぜてDNAポリメラーゼで反応し、2本鎖DNAを増幅する。プライマー (1) は、ターゲットDNAとは相補的でない部分に設計し、プライマー (2) は、環状になったプローブ (パドロック・プローブ: padlock probe) の末端部分 (ターゲットDNA) と相補的な配列 (3' 末端に遺伝子多型を含む) に設計し、多型検出には3' 末端の一塩基置換させたプライマーを用いる。パドロック・プローブに対してローリング・サイクル反応 (Rolling circle-reaction: RCA) を改良したハイパーブランチド・ローリング・サークル増幅法 (Hyperbranched rolling-circle amplification: HRC A) 法を用いて増幅させた後に、パドロック・プローブ内にある制限酵素認識サイトの制限酵素で処理し、電気泳動でバンドの有無を確認する。

#### 【0037】

##### (17) UCAN法

UCAN法 [タカラ酒造株式会社ホームページ (<http://www.takara.co.jp>) 参照] は、RNAをDNAが両側からはさんだ型のDNA-RNA-DNAブラ

イマー（DRDプライマー）の3'末端のDNAを化学変化させておき、DNAポリメラーゼによる鋳型DNAの複製が起こらないようにしておく。次に、一塩基変換が起こっている可能性のある塩基部位に、RNA部分が結合するように設計したDRDプライマーと鋳型DNAを対合させる。DRDプライマーと鋳型が完全にマッチしている場合のみRNアーゼHにより、対合したDRDプライマーのRNA部分が切断される。この切断によって3'末端が新しく出現するので、DNAポリメラーゼによる伸長反応が進み、鋳型DNAが増幅される。一方、DRDプライマーと鋳型DNAがその場所でマッチしていない場合、つまり、SNPが存在するときは、RNアーゼHがDRDプライマーを切断しないので、DNA増幅が起こらない。この遺伝子増幅の有無を検出することで遺伝子多型を検出することができる。

#### 【0038】

##### (18) DNAチップ又はDNAマイクロアレイ

DNAチップ又はDNAマイクロアレイは、多種類の多型部位を含むDNAプローブをガラス基盤上に固定したもので、これに標識した核酸試料をハイブリダイゼーションして、蛍光シグナルによって多型の有無を検出する。一般に、DNAをガラス基盤上で合成していくものをDNAチップ（オリゴDNAチップ）と称し、ガラス基盤上にcDNAを乗せていくものをDNAマイクロアレイと称する。基盤上に固定（又は合成）されるプローブは、オリゴDNAチップであれば、多型部位を含む20塩基程度のオリゴヌクレオチドが好ましく、cDNAマイクロアレイであれば、100～1500塩基程度の2本鎖DNAが好ましい。

#### 【0039】

##### (19) ECA (Electrochemical array) 法

ECA法は、DNAの2本鎖に結合するインターカレーターの電気化学的性質を利用した遺伝子タイピング法である。すなわち、多型を含む領域をPCR法により増幅し、基盤に固定化したそれぞれのアレルと相補するプローブとハイブリダイズ後にインターカレーターを作用させる。このとき、プローブに対して完全相補と不完全相補の場合で結合するインターカレーターの量が異なる。ECA法で用いるインターカレーターは、電気化学的性質を有するフェロセンという物質



を含有するため、結合したインターカレーターの量に比例して電氣的シグナルが異なる。ECA法は、この違いを利用して遺伝子多型を検出する方法

[[「アナリティカル・ケミストリー (Analytical chemistry)」, 2000年, 第72巻, p. 1334-1341] である。

#### 【0040】

以上は、本発明で用いることができる代表的な遺伝子多型検出方法であるが、これらに限定されず、他の遺伝子多型検出方法も本発明方法のために利用することができる。また、本発明方法においては、これらの遺伝子多型検出方法を単独で用いても、又は、二つ以上を組み合わせ用いてもよい。後述する実施例では、ASP-PCR法又はダイレクトシーケンス法を用いた本発明方法の具体的実施態様を示す。

#### 【0041】

##### [B] 本発明の試験方法

本発明の試験方法では、本発明の検出方法により薬物代謝速度がEMか、PMかを検出し、医薬品の試験に用いるイヌを選別し、次いでEM群又はPM群のイヌに被験薬を投与し、被験薬の薬理効果及び／又は毒性を試験する。この際EM群を用いることがより好ましい。

#### 【0042】

被験薬の薬理効果を試験する方法は、被験薬の適応症により適宜選択することができる。

毒性を試験する方法としては常法を用いることができ、例えば、ビーグル犬における単回経口投与毒性試験、ビーグル犬における2週間経口投与毒性試験、ビーグル犬における単回静脈内投与毒性試験、ビーグル犬における1週間静脈内投与毒性試験、ビーグル犬における4週間静脈内投与毒性試験、ビーグル犬における1週間静脈内持続投与毒性試験、ビーグル犬における4週間静脈内持続投与毒性試験、ビーグル犬における単回静脈内増量方式投与試験、ビーグル犬における2週間反復静脈内投与毒性試験、ビーグル犬における4週間反復経口投与毒性試験、ビーグル犬における13週間反復経口投与毒性試験、又はビーグル犬における52週間反復経口投与毒性試験等が挙げられる [マーヒン・メイナス (Mahin

・Maines) 主著「カレント プロトコールズ イン トキシコロジー ボリューム1, 2 (Current protocols in toxicology volume 1, 2)」, ジョンウィリー&ソンス社 (JohnWiley & Sons.Inc.), 2001年, p. 1.0.1-16.6.5; 及び白須泰彦, 吐山豊秋編「毒性試験ハンドブック」, 株式会社サイエンスフォーラム, 1980年5月, p. 81-282]。

#### 【0043】

本発明の試験方法は、イヌの選別と、被験薬の薬理効果及び／又は毒性の試験とを分担して行うこともでき、本発明の方法によりEM群又はPM群に選別されたイヌを入手し、EM群又はPM群のみを用いて被験薬の薬理効果及び／又は毒性を試験する方法も、本発明に含まれる。

#### 【0044】

##### [C] 本発明の一本鎖DNA

本発明の一本鎖DNAは、ストリンジェントな条件で、配列番号1で表される塩基配列又はその遺伝子多型を有するイヌCYP1A2遺伝子のセンス鎖若しくはアンチセンス鎖にハイブリダイスし、

(1) 配列番号1で表される塩基配列における405番目に該当する塩基を含み、その405番目に該当する塩基がCである、15塩基以上30塩基以下の一本鎖DNA [好ましくは、配列番号14で表される塩基配列からなる一本鎖DNA (すなわち、実施例3で使用したプライマーS07wild)]、

(2) 配列番号1で表される塩基配列における405番目に該当する塩基を含み、その405番目に該当する塩基がTである、15塩基以上30塩基以下の一本鎖DNA [好ましくは、配列番号16で表される塩基配列からなる一本鎖DNA (すなわち、実施例3で使用したプライマーS07mutant)]、及び

(3) (1) 若しくは(2)の相補鎖である、15塩基以上30塩基以下の一本鎖DNA

からなる群から選択される、15塩基以上30塩基以下の一本鎖DNAである。

#### 【0045】

本明細書において、「ストリンジェントな条件」とは、特に限定されるものではないが、好ましくは、実施例3に記載した反応系 (KOD用PCRバッファー

最終濃度 1 X、dNTP ミックス最終濃度各 0.2 mmol/L、硫酸マグネシウム最終濃度 1 mmol/L、PCR プライマーセット最終濃度各 0.3  $\mu$ mol/L、及び KOD-plus 最終濃度 0.02 Unit) 及び PCR 反応条件 (94℃ 2 分の後、94℃ 15 秒、56℃ 30 秒、及び 68℃ 30 秒からなるサイクルを 35 サイクル行い、更に 68℃ 1.5 分) である。

#### 【0046】

本発明の一本鎖 DNA は、本発明方法における、イヌ CYP1A2 遺伝子第 4 エキシソンの 87 番目の塩基 (すなわち、配列番号 1 で表される塩基配列における 405 番目に該当する塩基) の遺伝子多型の検出において、前記塩基が C 又は T のいずれであるかを決定するのに用いることができる。

本発明の一本鎖 DNA として、配列番号 14 又は 16 で表される塩基配列からなる DNA が特に好ましい。

#### 【0047】

##### 【実施例】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

##### 【実施例 1】

##### 《ビーグル犬 CYP1A2 の SNP 決定》

本実施例では、以下に示す手順に従って、ビーグル犬肝臓より単離したトータル RNA を鋳型として、RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction) 法により、ビーグル犬 CYP1A2 cDNA の部分塩基配列を同定し、更には一部のビーグル犬 CYP1A2 の SNP を決定した。

#### 【0048】

すなわち、予備検討試験 (後述する実施例 6 を参照) において群分けされた EM 型ビーグル犬 A 及び PM 型ビーグル犬 B の各 1 例ずつ (計 2 例) をペントバルビタール 50 mg/mL/kg 静脈内投与麻酔下において安楽死させ、動物解剖後、それぞれの肝臓を摘出した。摘出後、急速凍結させた肝臓より RNeasy Mini kit (QIAGEN 社) を用いて付随のプロトコールに従い、トータル RNA を回収した。

## 【0049】

回収したトータルRNAを用いて、500 ng トータルRNAを鋳型に逆転写酵素によってRNAからcDNA合成を、RNA LA PCR kit Ver.1.1（宝酒造株式会社）で実施した。逆転写反応における条件を以下に示す。

反応系：

25 mmol/L	塩化マグネシウム	8.0 $\mu$ L
10 x	RNA PCRバッファー	4.0 $\mu$ L
各10 mmol/L	dNTPミックス	4.0 $\mu$ L
40 U/ $\mu$ L	RNアーゼ阻害剤	1.0 $\mu$ L
5 U/ $\mu$ L	AMV逆転写酵素	2.0 $\mu$ L
2.5 $\mu$ mol/L	ランダムプライマー (Random 9mer)	2.0 $\mu$ L
	RNアーゼフリー滅菌水	21.0 $\mu$ L
	トータルRNA	500.0 ng
合計		40.0 $\mu$ L

[逆転写反応条件：30℃10分，55℃20分，95℃5分，5℃5分を1サイクル]

## 【0050】

続いて、逆転写反応において合成された一本鎖cDNAを鋳型に、DNAポリメラーゼ酵素としてKOD-plus-（東洋紡社）を用いてPCRを実施した。イヌCYP1A2 cDNA部分塩基配列を認識するPCRプライマーとしては、プライマーS01（配列番号2）及びプライマーA01（配列番号3）のセット、プライマーS02（配列番号4）及びプライマーA02（配列番号5）のセット、プライマーS03（配列番号6）及びプライマーA03（配列番号7）のセット、並びにプライマーS04（配列番号8）及びプライマーA04（配列番号9）のセットからなる、計4つのPCRプライマーセットを用いた。なお、プライマーは、Easy Oligos（プロリゴ・ジャパン株式会社）を使用した。

## 【0051】

PCR反応条件を以下に示す。

反応系：

10 x	KOD用PCRバッファー	3.0 $\mu$ L
------	--------------	-------------

各2 mmol/L	dNTPミックス	3.0 $\mu$ L
25 mmol/L	硫酸マグネシウム	1.2 $\mu$ L
各10 $\mu$ mol/L	PCRプライマーセット	0.9 $\mu$ L
1 Unit/ $\mu$ L	KOD-plus-	0.6 $\mu$ L

(以上、PCR反応溶液A)

10 pg - 200 ng	逆転写一本鎖cDNA	1.0 $\mu$ L
	滅菌水	20.3 $\mu$ L
合計		30.0 $\mu$ L

[PCR反応条件: 94℃2分, (94℃15秒, 55℃30秒, 68℃1.5分) を35サイクル, 68℃1.5分]

#### 【0052】

PCRの結果、増幅されたDNA断片の大きさは、S01及びA01のプライマーセットからは798bpであり、S02及びA02のプライマーセットからは951bpであり、S03及びA03のプライマーセットからは551bpであり、S04及びA04のプライマーセットからは658bpであった。増幅された各DNA断片は、ExoSAP-IT (USB社) を用いて付随のプロトコールに従い精製した。CYP1A2遺伝子の各多型部位を同定するための塩基配列の決定は、精製したDNA断片をDNAシーケンサー (ABI PRISM 377; アプライドバイオシステムズ社) を用いて常法により解析した。シーケンス解析に用いたプライマーとして、PCRプライマーS01、S02、S03、S04、A01、A02、A03、及びA04を用いた。

#### 【0053】

その結果、存在することが確認された遺伝子多型を表1にまとめた。なお、塩基配列の番号は、ビーグル犬CYP1A2遺伝子に関する既知の塩基配列 (Molecular pharmacology, 1990年, 第38巻, p. 644-651) の最初の塩基を1番とする番号とし、前述の既知配列を公知塩基配列とした。

#### 【0054】

【表 1】

塩基配列 番号	公知塩基 配列	公知配列の 対応アミノ酸	EM型	PM型	変異型配列の 対応アミノ酸
28	A	Ile	G	A	Val
141	T	Pro	C	T	Pro
225	C	Ser	T	C	Ser
300	G	Leu	C	G	Phe
307	A	Ile	G	A	Val
309	T	Ile	G	T	Val
316	A	Ser	G	G	Gly
325	A	Met	C	A	Leu
328	T	Ser	A	T	Thr
363	C	Ala	G	G	Ala
364	G	Gly	C	C	Arg
492	A	Glu	G	A	Glu
538	C	Leu	A	C	Met
652	T	Ser	A	T	Asn
653	C	Ser	A	C	Asn
664	T	Leu	G	T	Val
738	T	Phe	C	T	Phe
795	T	Ser	T	T/A	Arg
831	C	Asn	T	T	Asn
982	C	Gln	A	A	Lys
1087	C	Arg	C	T	*** : stop codon
1102	G	Val	G	A	Ile
1206	C	Gln	C/G	C	Glu
1262	T	Gly	T/C	T	Gly
1266	G	Ala	G/A	G	Thr
1269	C	Gly	T	C	Gly
1273	A	Thr	G	G	Ala
1421	A	Asn	A	G	Arg

## 【0055】

これら SNP の中で、特に既知 CYP1A2 遺伝子の 1087 番目の塩基が C から T へと置換されており、アミノ酸がアルギニンからストップコドンに変換す

る SNP がビーグル犬 B より見いだされたことが、最も PM 型ビーグル犬 B の CYP1A2 の代謝活性を著しく変化させていると推察された。続いて、この CYP1A2 遺伝子の 1087 番目の塩基が C から T へと置換する SNP を容易に検出するために、ゲノム DNA 上での SNP の位置を探索した。

#### 【0056】

##### 【実施例 2】

《CYP1A2 遺伝子第 4 エキシソンの 87 番目の塩基が C から T へと置換する SNP》

本実施例では、以下に示す手順に従って、他の哺乳類 CYP1 ファミリーのゲノム情報を参考に目的 SNP の位置を予測し、ビーグル犬白血球中のゲノム DNA を単離し、PCR を実施後、ダイレクトシーケンス法により目的 SNP 周辺のゲノム DNA 塩基配列を決定した。

#### 【0057】

すなわち、ヒト CYP1A1 (NCBI アクセッション・ナンバー: AF253322)、ヒト CYP1A2 (NCBI アクセッション・ナンバー: AF253322)、マウス CYP1A1 (NCBI アクセッション・ナンバー: X01681)、マウス CYP1A2 (NCBI アクセッション・ナンバー: X01682)、ラット CYP1A2 (NCBI アクセッション・ナンバー: K02246)、及びラット CYP1A2 (NCBI アクセッション・ナンバー: K03241) のエキソン及びイントロンの大きさを比較すると、イントロンの大きさは各分子種で異なっていたが、エキソンの大きさはそれぞれのエキソンで種を超えて保存されていた。つまり、これらの哺乳類 CYP1 ファミリーの第 1 エキシソンの大きさは約 830 bp であり、第 2 エキシソンの大きさは約 120 bp であり、第 3 エキシソンの大きさは約 89 bp であり、第 4 エキシソンの大きさは約 123 bp であり、第 5 エキシソンの大きさは約 86 bp であり、第 6 エキシソンの大きさは約 285 bp であった。この情報を踏まえて目的 SNP の位置を第 4 エキシソン内に存在すると予測した。

#### 【0058】

イヌゲノム DNA は、ビーグル犬より無処理注射針で採血した全血を EDTA・2K 入り滅菌済みバキュティナ採血管 (日本ベクトン・ディッキンソン株式会

社)にて確保した。全血よりGenとるくん<sup>TM</sup>(血液用)(宝酒造株式会社)を用いて付随しているプロトコールに従い、イヌゲノムDNAを抽出した。

抽出したゲノムDNAを鋳型に用いて目的のSNPを含有するゲノムDNA領域を増幅させるために、DNAポリメラーゼ酵素としてKOD-plus-(東洋紡社)を用いてPCRを実施した。プライマーセットとして、第4エクソン前後の第3イントロン及び第4イントロンの塩基配列を明らかにするために、予想される第3エクソン内にセンス方向のプライマーS05(配列番号10)を、第5エクソン内にアンチセンス方向のプライマーA05(配列番号11)を設計した。プライマーはEasy Oligos(プロリゴ・ジャパン株式会社)を使用した。

#### 【0059】

PCR反応条件を以下に示す。

反応系:

PCR反応溶液A	8.7 $\mu$ L
10 pg - 200 ng ゲノムDNA	2.0 $\mu$ L
滅菌水	19.3 $\mu$ L
合計	30.0 $\mu$ L

[PCR反応条件: 94℃2分, (94℃15秒, 56℃30秒, 68℃30秒)を35サイクル, 68℃1.5分]

#### 【0060】

PCRの結果、S05及びA05のプライマーセットにより増幅されたDNA断片の大きさは1380bpであった。増幅されたDNA断片は、ExoSAP-IT(USB社)を用いて付随のプロトコールに従い精製した。CYP1A2遺伝子の多型部位を同定するための塩基配列の決定は、精製したDNA断片をDNAシーケンサー(ABI PRISM 377:アプライドバイオシステムズ社)を用いて常法により解析した。シーケンス解析に用いたプライマーとして、PCRプライマーS05、A05、S06(配列番号12)、及びA06(配列番号13)を用いた。

#### 【0061】

その結果、配列番号1で表される塩基配列が決定された。配列番号1で表される塩基配列における405番目のTが目的SNP箇所である。



CYP1A2 cDNA塩基配列及び高等真核生物のイントロンの両端には、GT及びAGというコンセンサス配列が存在する。「GT-AG」ルールに従って、CYP1A2ゲノムDNAにおける第3イントロン、第4エキソン、及び第4イントロンの塩基配列を同定した。その結果、配列番号1で表される塩基配列において、63番目～318番目が第3イントロンであり、319番目～442番目が第4エキソンであり、443番目～1338番目が第4イントロンであると考えられる。

以上の結果より、目的SNPは、CYP1A2遺伝子の第4エキソン87番目の塩基におけるCからTへの置換であることが判明した。

#### 【0062】

##### 【実施例3】

##### 《ASP-PCR法によるSNP検出》

本実施例では、以下に示す手順に従って、CYP1A2遺伝子の第4エキソン87番目の塩基がCからTへと置換するSNPを検出するため、ビーグル犬白血球中のゲノムDNAを単離し、ASP-PCRを実施後、アガロースゲル電気泳動パターンによってSNPの存在を判定した。

#### 【0063】

すなわち、イヌゲノムDNAは、実施例2で述べた方法と同一の方法で抽出した。

抽出したゲノムDNAを鋳型に用いてDNAポリメラーゼ酵素としてKOD-plus-（東洋紡社）を用いてPCRを実施した。アレル特異的に反応するPCRプライマーセットとしては、プライマーS07wild（配列番号14）及びプライマーA07（配列番号15）のセット、並びにプライマーS07mutant（配列番号16）及びプライマーA07のセットの、2つのPCRプライマーセットを用いた。配列番号14で表される塩基配列における19番目（C）及び配列番号16で表される塩基配列における19番目（T）が目的SNPを認識する箇所である。プライマーは、Easy Oligos（プロリゴ・ジャパン株式会社）を使用した。

#### 【0064】

PCR反応条件を以下に示す。

反応系:

PCR反応溶液A	8.7 $\mu$ L
10 pg - 200 ng ゲノムDNA	1.0 $\mu$ L
滅菌水	20.3 $\mu$ L
合計	30.0 $\mu$ L

[PCR反応条件: 94℃2分, (94℃15秒, 59℃30秒, 68℃30秒)を35サイクル, 68℃1.5分]

#### 【0065】

PCRの結果、増幅されたDNA断片の大きさは、S07 wild及びA07プライマーセット、並びにS07 mutant及びA07プライマーセットからはいずれも365bpであった。アガロースゲル電気泳動の結果、CYP1A2遺伝子の第4エクソン87番目の塩基がCからTへと変異するSNPにおいて、Cアレルをホモで持つ場合は、S07 wild及びA07プライマーセットでのみ、DNA断片が増幅された。両アレルをヘテロで持つ場合は、S07 wild及びA07プライマーセット、並びにS07 mutant及びA07プライマーセットのいずれにおいても、DNA断片が増幅された。Tアレルをホモで持つ場合は、S07 mutant及びA07プライマーセットでのみ、DNA断片が増幅された。

#### 【0066】

##### 【実施例4】

##### 《ダイレクトシーケンス法によるSNP検出》

本実施例では、以下に示す手順に従って、CYP1A2遺伝子の第4エクソン87番目の塩基がCからTへと置換するSNPを検出するため、ビーグル犬白血球中のゲノムDNAを単離し、PCRを実施後、ダイレクトシーケンスによってSNPの存在を判定した。

#### 【0067】

すなわち、イヌゲノムDNAは、実施例2で述べた方法と同一の方法で抽出した。

抽出したゲノムDNAを鋳型に用いてDNAポリメラーゼ酵素としてKOD-plus- (東洋紡社) を用いてPCRを実施した。PCRプライマーとして、プライマーS05及びプライマーA07がセットのPCRプライマーセットを用いた。プライマーはEasy Oligos (プロリゴ・ジャパン株式会社) を使用した。

#### 【0068】

PCR反応条件を以下に示す。

反応系:

PCR反応溶液A	8.7 $\mu$ L
10 pg - 200 ng ゲノムDNA	1.0 $\mu$ L
滅菌水	20.3 $\mu$ L
合計	30.0 $\mu$ L

[PCR反応条件: 実施例2と同様]

#### 【0069】

PCRの結果、増幅されたDNA断片の大きさは、S05及びA07プライマーセットからは752bpであった。増幅されたDNA断片は、ExoSAP-IT (USB社) を用いて付随のプロトコルに従い精製した。CYP1A2遺伝子の各多型部位を同定するための塩基配列の決定は、精製したDNA断片をDNAシーケンサー (ABI PRISM 377: アプライドバイオシステムズ社) を用いて常法により解析した。シーケンス解析に用いたプライマーとして、PCRプライマーS08 (配列番号17) 及びA08 (配列番号18) を用いた。

#### 【0070】

その結果、シーケンス波形によりCYP1A2遺伝子の第4エクソン87番目の塩基がCからTへと置換するSNPの塩基配列を同定した。Cアレルをホモで持つ場合は、Cの波形のみが検出された。両アレルをヘテロで持つ場合は、C及びT両方の波形が検出された。Tアレルをホモで持つ場合は、Tの波形のみが検出された。

#### 【0071】

##### 【実施例5】

##### 《アレル頻度解析》

本実施例では、以下に示す手順に従って、CYP1A2 遺伝子の第4エクソン 87番目の塩基がCからTへと置換するSNPのアレル頻度を解析するため、実施例3及び実施例4の試験結果を採用した。

ビーグル犬65例のCYP1A2 遺伝子第4エクソンの87番目の塩基がCからTへと置換するSNP 遺伝子診断結果を、表2に示す。

【0072】

【表2】

動物種	例数	遺伝子型		
		C/C	C/T	T/T
ビーグル犬	65例	25	29	11
		(0.38)	(0.45)	(0.17)

【0073】

表2において、CYP1A2 遺伝子の第4エクソンの87番目がCである遺伝子をホモで有するものは「C/C」、前記部位がTである遺伝子をホモで有するものは「T/T」、そして、両遺伝子をヘテロで有するものは「T/C」として表記する。表2に示すとおり、C/Cが25例（38%）であり、C/Tが29例（45%）であり、T/Tが11例（17%）であった。アレル頻度は、Cアレルが0.61であり、Tアレルが0.39であった。

【0074】

#### 【実施例6】

##### 《ビーグル犬を用いた薬物動態試験》

フォスフォジエステラーゼIV阻害薬である4-シクロヘキシル-1-エチル-7-メチルピリド[2,3-D]ピリミジン-2(1H)-オン（国際公開W097/19078号パンフレット又は特許第3110765号明細書の実施例7参照；以下、化合物Aと称する）は、ビーグル犬において、MM-1からMM-5までの5種の代謝物に代謝されることが知られている。これらはいずれも一水酸化体であり、第一相薬物代謝反応による生成物と考えられている。宮下（Miyashita）らは、ビーグル犬をMM-2が血漿中主代謝物である群及びMM-1ならびにMM-5が主代謝物である群に大別できることを報告している〔「第17回日本薬物動態学

会年会ポスター発表」, (日本), 2002年, 20PE-46]。

### 【0075】

本実施例では、以下に示す手順に従って、化合物Aを経口投与後、未変化体及び代謝物の濃度推移を測定する薬物動態試験を実施した。

すなわち、雄性ビーグル犬10例に、0.5%メチルセルロース溶液に懸濁させた化合物A投与液を経口投与(0.3mg/kg)後、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、及び8.0時間後に採血を実施した。血漿を液-液抽出後、未変化体及び代謝物の高性能液体クロマトグラフィーを用いた蛍光検出器による同時測定法(以下、HPLC-FL法と称する)に従い血漿中濃度推移を測定した。

### 【0076】

化合物A及び代謝物同時測定HPLC-FL法の条件を以下に示す。

カラム : COSMOSIL 5PE-MS waters 4.6 (i.d.) x 250 mm  
 カラム温度 : 40℃  
 移動相 : A液; 50 mmol/L酢酸:アセトニトリル = 80:20  
           : B液; 50 mmol/L酢酸:アセトニトリル = 20:80  
 流速 : 1.0 mL/min  
 蛍光検出 : 励起波長330 nm, 蛍光波長400 nm

また、移動相濃度勾配を表3に示す。

### 【0077】

【表3】

時間(分)	0	18	30	47	47.01	55(停止)
移動相 A 液	90	90	50	50	90	90
移動相 B 液	10	10	50	50	10	10

### 【0078】

本実施例に用いた薬物動態試験用ビーグル犬は、表現型解析の予備検討を行なうことにより選択し、MM-2が主代謝物であるイヌ(I型)を5例、MM-1及びMM-5が主代謝物であるイヌ(II型)を5例用いた。化合物A及び代謝物

の血漿中濃度推移について、I型の結果を図1に、II型の結果を図2にそれぞれ示す。

【0079】

薬物動力学パラメータである最高血漿中濃度到達時間 ( $T_{max}$ )、最高血中薬物濃度 ( $C_{max}$ )、無限大時間までの血中濃度下面積 ( $AUC_{inf}$ )、及び血中半減期 ( $T_{1/2}$ ) を算出した。結果を表4に示す。

【0080】

【表 4】

表現型解析	測定物	Tmax (hr)	Cmax (ng/mL)	AUCinf (hr·ng/mL)	T1/2 (hr)
I 型 (n = 5)	MM-1	0.5 ± 0.0	13.0 ± 5.0	17.7 ± 7.4	0.6 ± 0.1
	MM-2	0.5 ± 0.0	106.8 ± 52.9	171.5 ± 101.2	0.8 ± 0.1
	MM-3	0.3 ± 0.1	7.9 ± 5.1	6.1 ± 4.1	0.3 ± 0.0
	MM-4	0.3 ± 0.1	6.0 ± 2.3	4.3 ± 2.0	0.4 ± 0.0
	MM-5	0.3 ± 0.1	9.0 ± 4.9	6.7 ± 3.7	0.3 ± 0.1
	未変化体	0.3 ± 0.0	3.2 ± 1.5	2.8 ± 1.6	0.6 ± 0.2
	MM-1	1.8 ± 0.4**	42.0 ± 9.0**	355.4 ± 83.3**	4.6 ± 0.6**
	MM-2	0.6 ± 0.2	6.1 ± 1.3**	15.9 ± 5.9**	1.3 ± 0.2**
	MM-3	0.4 ± 0.1	3.8 ± 0.7	5.4 ± 1.7	0.7 ± 0.1**
	MM-4	0.4 ± 0.1	27.5 ± 14.9*	35.4 ± 19.8**	0.6 ± 0.1**
II 型 (n = 5)	MM-5	0.7 ± 0.3*	136.8 ± 48.1**	366.3 ± 191.5**	1.1 ± 0.1**
	未変化体	0.3 ± 0.1	24.0 ± 14.8*	27.2 ± 20.2*	0.8 ± 0.4

\*\* : p &lt; 0.01, \* : p &lt; 0.05

【0081】

未変化体に関する薬物動力学パラメータは、CmaxではII型はI型の7.5倍であり、AUCinfではII型はI型の9.7倍であった。以上より、I型がEM型であり、II型がPM型であることがわかる。

また、実施例5におけるCYP1A2遺伝子の第4エキソン87番目の塩基が

CからTへと置換するSNP遺伝子診断の結果、EM群のビーグル犬はC/C遺伝子型が2例で、C/T遺伝子型が3例であり、一方、PM群のビーグル犬においては5例全てがT/T遺伝子型であった。

#### 【0082】

##### 【発明の効果】

本発明においては、イヌCYP1A2遺伝子の第4エキソン87番目の塩基がCからTへと置換するSNPを見い出した。このSNPによりCYP1A2タンパク質のアルギニンに対応するコドンがストップコドンへと変化する。従って、T/T遺伝子型を有するイヌではCYP1A2タンパク質が発現しないため、C/C遺伝子型又はC/T遺伝子型を有するイヌと比較して、CYP1A2で代謝される薬物の血漿中濃度が極めて高くなることが予測される。このことは、本発明の実施例で述べたように、フォスフォジエステラーゼIV阻害剤である化合物Aの体内動態から証明されている。また、本発明においては、このSNPを簡便に検出する方法としてASP-PCR法及びダイレクトシーケンス法を確立した。これらの方法を用いてイヌ65例のCYP1A2の遺伝子診断を実施することによりアレル頻度を明らかにした。

#### 【0083】

本発明で明らかにしたように、イヌCYP1A2には第4エキソン87番目にストップコドンを生じるSNPが存在し、約15%のイヌがこのSNPをホモで有している。このSNPは化合物Aで認められたように、CYP1A2で代謝される薬物のイヌにおける体内動態の個体差の大きな要因となっている。化合物の薬理効果及び毒性の発現は体内動態に依存している。そのため、前記化合物がCYP1A2で代謝される場合には、薬理効果及び毒性評価においても大きな個体差が生じるものと考えられる。本発明によれば、イヌにおける薬理効果試験及び毒性試験の実施に先立ち、使用される個体のCYP1A2の遺伝子診断を迅速に実施することができる。これにより、遺伝的に均質な個体により薬理効果試験及び毒性試験を実現することができ、本発明以前より正確な薬理効果及び毒性評価が可能となる。

#### 【0084】



## 【配列表】

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Canine CYP1A2 genetic polymorphism

<130> YAM033273P

<160> 18

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1380

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<220>

<223> Inventor: Tenmizu, Daisuke; Fukunaga, Yasuhisa; Noguchi, Kiyoshi

<400> 1

ctggagtctt atgtaccttg tggcaaacc tgagatacag agaaagatcc agaaggagtt 60

gggtatgcgg tagagatgca caagctaaga gaagcttgag atccccaggt tctttgttca 120

atgacatata gctgttgtgt gcctaccatg tgtaagccct gggcatacac tggtgccac 180

ccttgccctag aacatgctgg ggtaggggtgg ttactgggcc ttagatatat aacagacagt 240

actatgtaat aggggactta gataccatga agcagtcggg gcagccctaa gcccggtttg 300

gtcttctgtg ttctgcagac acggtgattg gcagggcacg gcagcctcgc ctctctgaca 360  
ggccccagct gcccttaatg gaggccttca tcctggagat cttctgacac acctccttta 420  
tccccttcac catccccac aggtaaggcc tgcttcttct gccttgccac ctttgtagcc 480  
ttcaccatgt ttcttctcc catcttctca gccctggatc tggctcagac ctcggcctct 540  
cacttctggc cacgtcacca agttccccctc agcctcttgg ctgccgaaa ccaatccaac 600  
catgatcaaa ctaccagct ttcaggagaa agtcacactg ctgatctcag ctctcattca 660  
cctctgctca cattcctttc ctgcaagtac tctcaatcca cccgggctgg cctcgctgta 720  
cctccccagc atgatgcggt caacctccaa ttttgcttat gctggacctt ctgcctggaa 780  
tgcttttta cctcttctcc caccacctga atcttacct tgcccaaggc caatcctgac 840  
acaaacttcc ccttcactat caggctttct tgactcatcc agctggcaca gcttcattct 900  
ctgatgtatt gtaggacttt cagccatttg tccttgatca tgccttgggc ttttaacaac 960  
atcaagagac ttagtgaaca ttactctta cccatatgtt ggtctattta ttcccagagt 1020  
agaaggctctg actcctcagt caggctggga actaccagg gatactccag actgccagtt 1080  
tcttgcttc agaggatggc gaagtgcaca gctggacaca aacaaagggt tagtgaacac 1140

ttgctgaagt tgaagaacag aagctgagga agaggaagga tagtttcacc ctttccgtgc 1200

tcctgatagt cctccccagt gtaggacata gagactgtgg gggacaagct attgggggtgg 1260

aagaaggagc aagtagatcc cagagacaca cccagtggtt cctgccctga gcctgacaga 1320

gccctcttcc ctccctcagca caacaaagga cacaacctta aagggttct acatcccaa 1380

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 2

cctccacat cttctgcttg 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 3

atgtcctgga cactgcgctc 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 4

tccccctcct aatgagctcc 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 5

gaggccatgg gtgatacttc 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 6

cctccacat cttctgcttg 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

&lt;400&gt; 7

caatgacatt ggccactgac

20

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Canis familiaris

&lt;400&gt; 8

tttggggccg gatttgacac

20

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Canis familiaris

&lt;400&gt; 9

gaggccatgg gtgaccttc

20

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Canis familiaris

&lt;400&gt; 10

ctggagtctt atgtacct

18

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 11

ccactggttt atgaagac

18

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 12

tgcccttaat ggaggcctt

19

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 13

acgacacccc ctaccacttc

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 14

ttcatcctgg agatcttccg

20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 15

aattggaggt tgaccgcatc

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 16

ttcatcctgg agatcttctg

20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 17

cccggtttgg tcttctgtgt 20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 18

tgacgtggcc agaagtgaga 20

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図 1】

I 型ビーグル犬における、4-シクロヘキシル-1-エチル-7-メチルピリ  
ド [2, 3-D] ピリミジン-2 (1H)-オン及び代謝物の血漿中濃度推移を  
示すグラフである。

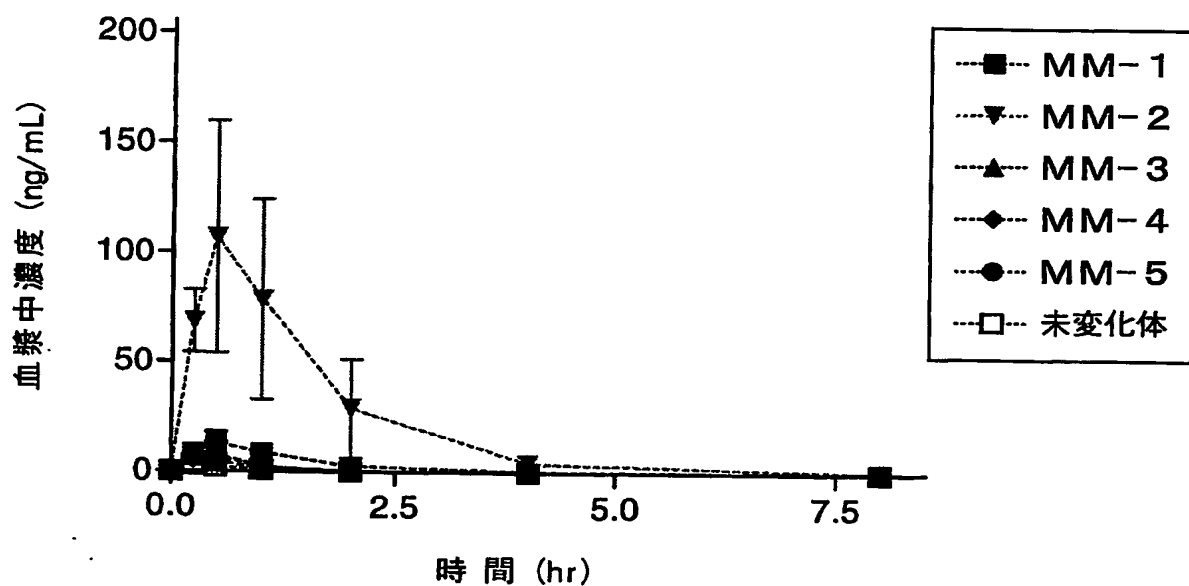
##### 【図 2】

II 型ビーグル犬における、4-シクロヘキシル-1-エチル-7-メチルピリ  
ド [2, 3-D] ピリミジン-2 (1H)-オン及び代謝物の血漿中濃度推移を  
示すグラフである。

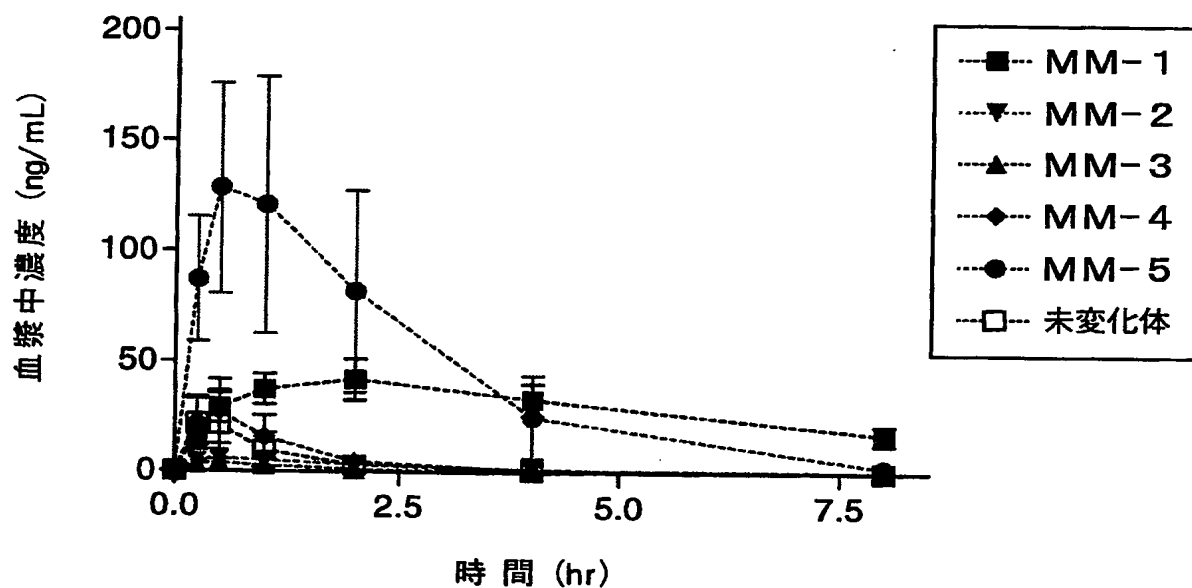


【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 イヌ（特にはビーグル犬）における薬理効果試験及び毒性試験の実施に先立ち、使用される個体のCYP1A2の遺伝子診断を迅速に実施し、正常な代謝能力を持つ群（エクステンシブ・メタボライザー群）、又は、薬物代謝能力が低い群（プアー・メタボライザー群）に、群分けすることができる簡便な方法を提供する。

【解決手段】 前記方法では、イヌからDNA試料を得、イヌCYP1A2遺伝子の第4エクソン87番目の塩基を決定することにより、薬物代謝速度がエクステンシブ・メタボライザーであるか、又は、プアー・メタボライザーであるかを検出する。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-152917
受付番号	50300895990
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成15年 6月10日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年 5月29日
-------	-------------

次頁無

特願 2 0 0 3 - 1 5 2 9 1 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 6 6 7 7 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 1 0 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋本町 2 丁目 3 番 1 1 号

氏 名

山之内製薬株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**